

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年4 月11 日 (11.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/28367 A1

(51) 国際特許分類: A61K 9/127, 47/24, 47/44, 31/711, 31/70, 31/74, 48/00, 38/02, B01J 13/12

土狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 秋永士朗 (AKINAGA, Shiro) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08759

(22) 国際出願日: 2001 年10 月4 日 (04.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-305065 2000 年10 月4 日 (04.10.2000) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤泰己 (KATO, Yasuki) [JP/JP]. 山内雅博 (YAMAUCHI, Masahiro) [JP/JP]. 草野宏子 (KUSANO, Hiroko) [JP/JP]. 岩田武士 (IWATA, Takeshi) [JP/JP]. 魚地孝聡 (UCHI, Takaaki) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF COATING FINE PARTICLE WITH LIPID FILM

(54) 発明の名称: 脂質膜による微粒子の被覆方法

(57) Abstract: A simple method of coating fine particles with a lipid film safely and efficiently. The method is characterized in that an aqueous polar-organic-solvent solution which contains fine particles dispersed therein and a lipid dissolved therein is modified so as to reduce the proportion of the polar organic solvent to thereby coat each fine particle with a lipid film.

(57) 要約:

本発明の目的は、安全、簡便かつ効率の良い脂質膜による微粒子の被覆方法を提供することにある。

微粒子が分散し、かつ脂質が溶解した極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって、該微粒子を脂質膜で被覆することを特徴とする、脂質膜による微粒子の被覆方法を提供する。



WO 02/28367 A1

明 細 書

## 脂質膜による微粒子の被覆方法

技術分野

本発明は、脂質膜による微粒子の被覆方法に関する。

背景技術

微粒子に薬物を内包させて薬物の効果を高める技術は公知であり、例えばリポソームや脂肪乳剤などが知られている。これらの臨床応用は主として注射により行われ、注射の中でもとりわけ血管内投与により行われる。血管内に投与された微粒子は血液成分と相互作用することが知られているが、相互作用により微粒子そのものまたは薬物が破壊（分解）されたり、微粒子がオプソニンを受けて、血中から除去されたりする（細網内皮系により異物として除去される）。これを克服するため、例えばリポソームのポリエチレングリコール修飾が研究されている [Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, 93-102 (1995)]。

また、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA などの核酸を標的細胞に送達するため、カチオン脂質を含む脂質からなるリポソーム（以下、カチオン脂質リポソームという）やポリ L-リジン、ポリアミドアミンなどの塩基性ポリマーと核酸との複合体がしばしば利用される。しかし、カチオン脂質リポソームと核酸との複合体は静脈内に投与した後、速やかに血中から肝臓や肺などに移行することが知られている [Biochim. Biophys. Acta, 1281, 139-149 (1996); J. Controlled Release, 41, 121-130 (1996)]。一方、S. Li らはマウス血清とカチオン脂質リポソーム／DNA 複合体を接触させることにより複合体の大きさの増大、凝集、リポソームの崩壊、DNA の放出および分解が起こることを報告している [Gene Therapy, 5, 930-937 (1998) ; Gene Therapy, 6, 585-594 (1999)]。これらを解決する目的でカチオン脂質リポソームのポリエチレングリコール修飾が研究され、O. Meyer らはポリエチレングリコールホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む

カチオン脂質リボソームとオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の複合体を調製した [J. Biol. Chem., 273, 15621-15627 (1998)]。しかし、50%ヒト血漿水溶液と4時間接触させることで35%のODNが解離した。これを改良すべく D. Stuart と T. Allen はカチオン脂質リボソームをクロロホルムに予め溶解し、次いでODNの水溶液とメタノールを加え混合後、遠心分離することでクロロホルム層にカチオン脂質リボソーム/ODNの複合体を移行させた。さらにこのクロロホルム層を取り出し、これにPEG脂質と中性の脂質と水を加え W/O エマルジョンを形成させ、以後 F. Szoka らの逆相蒸発法と同様に処理し ODN をリボソーム内部に完全に内包しようと試みた [Biochim. Biophys. Acta, 1463, 219-229 (2000)]。しかし、クロロホルムの使用は安全性の観点から近年は望ましくないとされている。さらに D. Mc Phail らはパルミトイルキトサンとコレステロールのベシクル懸濁液 (キトサンベシクル) を卵黄ホスファチジルコリンとコレステロールの薄膜に添加してリボソーム中にキトサンベシクルを入れるベシクルインベシクル (vesicle in vesicle) を調製した [Int. J. Pharmaceutics, 200, 73-86 (2000)]。しかしながら、内包効率に関する記載は無く、調製法から推察すると数%程度の低い内包率と予測され実用化に当たっては問題となることが予想される。これらの観点からも、簡便かつ効率の良い微粒子の閉鎖小胞による内包化は医療への応用を考えた場合非常に有用である。

また、医療上有用な多くのペプチド、蛋白質は生体において酵素などにより速やかに分解されたり頻回投与により抗体が生成し生体内から除去されたりして効力を発揮できない場合がある。そこで、これらペプチド、蛋白質の生体内での安定性を高める目的でリボソーム化が試みられている。リボソーム化の手段としては例えば、バングハム (Bangham) らのリボソーム調製法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 13, 238 (1965)]、エタノール注入法 [ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J. Cell. Biol.), 66, 621 (1975)]、フレンチプレス法 [フェブス・レター(FEBS Lett.), 99, 210 (1979)]、凍結融解法 [アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch.

Biochem. Biophys.), 212, 186 (1981)]、逆相蒸発法 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 4194 (1978)]、pH 勾配法 (特許第 2572554 号公報、特許第 2659136 号公報など) などが知られている。低分子化合物には pH 勾配法が優れており改良方法も編み出されている。しかしながら、ペプチド、蛋白質では必ずしも効率の良い内包化は達成されておらず、蛍光ラベル化インスリンでは 5～40 % 程度内包されたがインスリンは全く内包されなかった [Int. J. Pharmaceutics, 179, 85-95 (1999)]。ペプチド、蛋白質による治療効果を高めるためにはペプチド、蛋白質を閉鎖小胞内に効率良く内包させる方法を開発することが課題である。

#### 発明の開示

本発明の目的は、微粒子に含有される薬物などを生体内で安定化させるための脂質膜による該微粒子の安全、簡便かつ効率的な被覆方法を提供することにある。該被覆方法を用いて、微粒子を脂質二重膜または多重膜からなる閉鎖小胞内に包むことにより、生体内、とりわけ血液内または消化管内の成分および細網内皮系などの影響、さらに保存中における微粒子同士または微粒子が分散している分散媒の影響を受けることを抑制することができる。

本発明者らは、水溶性薬物とカチオン脂質からなる静電的相互作用による複合体がエタノール水溶液に溶解せず、一方リン脂質はエタノール含量の高いエタノール水溶液には溶けるが、エタノール含量の低いエタノール水溶液中では脂質膜形成によるリポソームとなることを見出した。さらに鋭意検討を加えた結果、水溶性薬物と脂質の複合体にポリエチレングリコール化脂質などの水溶性高分子誘導体を予め加えておき、エタノール含量の高いエタノール水溶液に分散させ、次いで本液にポリエチレングリコール化脂質とリン脂質を溶解させた後、徐々にエタノール含量を低下させることにより先の薬物と脂質の複合体をポリエチレングリコール化脂質とリン脂質による脂質膜で被覆させることができることを見出すに至った。

すなわち、本発明は以下の（１）～（１９）に関する。

（１） 微粒子が分散し、かつ脂質が溶解した極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって、該微粒子を脂質膜で被覆することを特徴とする、脂質膜による微粒子の被覆方法。

（２） 極性有機溶媒含有水溶液に微粒子を分散させ（液Ａ）、該極性有機溶媒含有水溶液と同一もしくは異なった極性有機溶媒含有水溶液または極性有機溶媒に脂質を溶解させ（液Ｂ）、液Ａと液Ｂを混合し（液Ｃ）、次いで液Ｃ中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって（液Ｄ）、該微粒子を脂質膜で被覆することを特徴とする、脂質膜による微粒子の被覆方法。

（３） 液Ｂが脂質と一緒に水溶性高分子誘導体（Ｉ）を溶解させて得られる溶液である上記（２）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（４） 液Ａおよび液Ｂ中の極性有機溶媒の濃度が３０％以上である上記（２）または（３）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（５） 液Ａおよび液Ｂ中の極性有機溶媒の濃度が６０～９０％である上記（２）または（３）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（６） 液Ｄ中の極性有機溶媒の濃度が５０％以下である上記（５）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（７） 微粒子が上記（３）に記載の水溶性高分子誘導体（Ｉ）と同一または異なった水溶性高分子誘導体を含有する微粒子である上記（１）～（６）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（８） 微粒子が薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質および微粒子製剤から選ばれる一つ以上を含有する微粒子である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（９） 微粒子が薬物を含有する微粒子である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１０） 微粒子が薬物と脂質集合体、リポソーム、エマルジョン中の微粒子、

天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質および微粒子製剤から選ばれる一つ以上との複合体である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１１） 微粒子が薬物とカチオン脂質との複合体である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１２） 微粒子が薬物とアニオン脂質との複合体である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１３） 微粒子が薬物とリン脂質を含有するリポソームとデキストラン硫酸ナトリウムとの複合体である上記（１）～（７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１４） 薬物がペプチド、蛋白質、核酸、低分子化合物、糖類および高分子化合物から選ばれる薬物である上記（８）～（１３）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１５） 極性有機溶媒がアルコール類、グリコール類およびポリアルキレングリコール類から選ばれる一つ以上である上記（１）～（１４）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１６） アルコール類がエタノールである上記（１５）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１７） グリコール類がプロピレングリコールである上記（１５）または（１６）に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１８） ポリアルキレングリコール類がポリエチレングリコールである上記（１５）～（１７）のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

（１９） 水溶性高分子誘導体がポリエチレングリコール化脂質、ポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールヒマシ油誘導体、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類、ポリエチレングリコールステアリン酸エステル類、エチレングリコールプロピレングリコール共重合体およびグリセリンエステル類から選ばれる一つ以上である上記（３）～（１８）のいずれ

かに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

本発明で用いられる極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、イソブタノール、*tert*-ブタノールなどのアルコール類、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール類などがあげられる。

本発明で用いられる微粒子を構成するものは特に限定されるものではなく、例えば、薬物、脂質集合体、リボソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質、微粒子製剤、水溶性高分子誘導体などがあげられる。これらは、単独で、またはこれらを2つ以上組み合わせた複合体、もしくはこれらと他の化合物とを組み合わせた複合体として用いられる。

上記複合体として具体的には、薬物と脂質集合体、リボソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質および微粒子製剤から選ばれる一つ以上との複合体などがあげられ、さらに具体的には、静電的相互作用により形成される核酸とカチオン脂質との複合体；核酸とポリ-L-リジンなどの正電荷ポリマーとの複合体；等電点の高い塩基性蛋白質とホスファチジン酸などのアニオン脂質またはスチレンマレイン酸などの負電荷ポリマーとの複合体；酸性蛋白質とカチオン脂質やポリ-L-リジンなどの正電荷ポリマーとの複合体などがあげられる。

薬物としては、酵素を含む蛋白質、ペプチド、遺伝子を含む核酸、低分子化合物、糖類、高分子化合物などの薬理学的活性を有する物質があげられ、酵素を含む蛋白質またはペプチドとしては、ブラジキニン、アンジオテンシン、オキシトシン、バソプレシン、アドレノコルチコトロピン (ACTH)、カルシトニン、インスリン、グルカゴン、コレシストキニン、 $\beta$ -エンドルフィン、メラノサイト阻害因子、メラノサイト刺激ホルモン、ガストリンアンタゴニスト、ニューロテン

ション、ソマトスタチン、ブルシン、シクロスポリン、エンケファリン、トランスフェリン、RGD (Arg Gly Asp) ペプチド、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、性腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン (LHRH)、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、ウリカーゼ、カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、ストレプトキナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、ムラミルジペプチド、サイモポエチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、エリスロポエチン (EPO)、トロンボポエチン (TPO)、トリプシンインヒビター、リゾチーム、表皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、神経成長因子 (NGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、形質転換成長因子 (TGF)、内皮細胞成長因子 (ECGF)、フィブロブラスト (繊維芽細胞) 成長因子 (FGF)、グリア細胞成長因子 (GGF)、サイモシン、特異抗体 (例えば、抗EGF受容体抗体などがあげられる) などがあげられ、遺伝子を含む核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、センスオリゴヌクレオチド、DNA、RNAなどの核酸類があげられ、低分子化合物としては、イプシロン-アミノカプロン酸、塩酸アルギニン、L-アスパラギン酸カリウム、トラネキサム酸、硫酸ブレオマイシン、硫酸ビンクリスチン、セファゾリンナトリウム、セファロチンナトリウム、シチコリン、シタラビン、硫酸ゲンタマイシン、塩酸バンコマイシン、硫酸カナマイシン、硫酸アミカシンなどがあげられ、糖類としては、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヘパリンナトリウム、デキストランフルオレセインなどがあげられ、高分子化合物としては、ポリエチレンスルホン酸ナトリウム、DIVEMA (ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体)、SMANCS (スチレン無水マレイン酸共重合体-ネオカルチノスタチン結合体) などがあげられる。

脂質集合体としては、球状ミセル、球状逆ミセル、ソーセージ状ミセル、ソーセージ状逆ミセル、板状ミセル、板状逆ミセル、ヘキサゴナル I、ヘキサゴナル II および脂質 2 分子以上からなる会合体などがあげられる。

リボソームを構成する脂質としては、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフ



インゴ糖脂質、コレステロール、カチオン脂質などがあげられ、リン脂質が好ましく用いられる。これらの脂質は、ポリソルベート 80、プルロニック F68、ソルビタンモノラルラート（例えば Span 20）などの非イオン性界面活性剤、塩化ベンザルコニウムなどのカチオン性界面活性剤、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、デキストランなどの多糖類もしくはその誘導体、ポリオキシエチレンラウリルアルコール、ポリエチレングリコール（PEG）などのポリオキシエチレン誘導体などにより改質されていてもよい。

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンなど）、ホスファチジルエタノールアミン（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンなど）、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール化リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質などの天然または合成のリン脂質などがあげられる。

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどがあげられる。

また、スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどがあげられる。

カチオン脂質としては、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニオプロパン（DOTAP）、N-(2,3-ジオレイルオキシプロパン-1-イル)-N,N,N-トリメチル塩化アンモニウム（DOTMA）、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパナミニウムトリフルオロ酢酸（DOSPA）、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム（DMRIE）、1,2-ジオレオイルオキシプロピル-3-ジエチルヒドロキシエチル臭化アンモニウム（DORIE）、 $3\beta$ -[N-(N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コ

レステロール (DC-Chol) などがあげられる。

リポソームにおいては、これら脂質は、単独で、または組み合わせて用いられる。組み合わせて用いる場合、例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール化リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール化リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質、卵黄ホスファチジルコリンと DOTAP からなる脂質、卵黄ホスファチジルコリン、DOTAP およびポリエチレングリコール化リン脂質からなる脂質、卵黄ホスファチジルコリン、DOTAP、コレステロールおよびポリエチレングリコール化リン脂質からなる脂質などが脂質として用いられる。

また、リポソーム調製時には、必要に応じて、脂質と共に、膜安定化剤としてコレステロールなどのステロール類など、抗酸化剤としてトコフェロールなど、荷電物質としてステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ガングリオシドや DOTMA [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987)]、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(DOGS) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6982-6986 (1989)]、DMRIE もしくは DORIE [Methods, 5, 67-75 (1993)]、DC-Chol [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 179, 280-285 (1991)] などのカチオン脂質などを加えてもよい。

エマルジョン中の微粒子は特に限定されるものではなく、具体的には脂肪乳剤、非イオン性界面活性剤と大豆油からなるエマルジョン、リピッドエマルジョン、リピッドナノスフェアーなどを含むあらゆる O/W エマルジョンや W/O/W エマルジョン中の微粒子などがあげられる。

天然高分子は特に限定されるものではなく、具体的にはアルブミン、デキストラン、キトサン、デオキシリボ核酸などがあげられる。

合成高分子は特に限定されるものではなく、具体的にはポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピ

ルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、PEG 修飾デンドリマー、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸、PEG 化ポリ乳酸、デキストラン硫酸またはその塩などがあげられる。

ここで、塩は、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩などを包含する。金属塩としては、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩などがあげられ、アンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウムなどの塩があげられ、有機アミン付加塩としては、モルホリン、ピペリジンなどの付加塩があげられ、アミノ酸付加塩としては、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの付加塩などがあげられる。

金属コロイドとしては、金、銀、白金、銅、ロジウム、シリカ、カルシウム、アルミニウム、鉄、インジウム、カドミウム、バリウム、鉛などを含む金属コロイドがあげられる。

カチオン脂質としては、前記と同様のものがあげられる。

アニオン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトールなどがあげられる。

微粒子製剤としては、マイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノクリスタル、リピッドナノパーティクルポリマーミセルなどがあげられる。

微粒子として、好ましくはリポソームに薬物を内包させたものがあげられる。

微粒子の大きさとしては、平均粒子径が数 nm～数十  $\mu$ m であるのが好ましく、さらに好ましくは 10nm～1000nm である。

本発明で用いられる水溶性高分子誘導体は特に限定されるものではなく、PEG-PE、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-（ポリエチレングリコール 2000）（PEG-DSPE）などのポリエチレングリコール化脂質、ポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、CREMOPHOR EL などのポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート (Tween 80) などのポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類、ポリエチレングリコールステアリン酸エステル類、エチレングリコールプロピレングリコール共重合体、グリセリンエステル類、ポリエチレンイミン誘導体、ポリビニルアルコール誘導体、ポリアクリル酸誘導体、ポリアクリルアミド誘導体、デキストラン誘導体、ポリグリセリン誘導体、キトサン誘導体、ポリビニルピロリドン誘導体、ポリアスパラギン酸アミド誘導体、ポリ-L-リジン誘導体、マンナン誘導体、プルラン誘導体などがあげられる。

本発明で脂質膜に用いられる脂質としては、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロール、合成脂質などが用いられ、特にリン脂質が好ましく用いられる。リン脂質、グリセロ糖脂質およびスフィンゴ糖脂質としては、前記と同様のものがあげられ、合成脂質としては、フッ素添加ホスファチジルコリン、フッ素添加界面活性剤、臭化ジアルキルアンモニウムなどがあげられる。

本発明で用いられる微粒子が分散し、かつ脂質が溶解した極性有機溶媒含有水溶液の調製方法としては、例えば極性有機溶媒含有水溶液に微粒子を分散させ(液A)、該極性有機溶媒含有水溶液と同一もしくは異なった極性有機溶媒含有水溶液または極性有機溶媒に脂質を溶解させ(液B)、次いで液Aと液Bを混合する方法があげられる。

本発明の脂質膜による微粒子の被覆方法としては、具体的には例えば以下の方法があげられる。

(工程1) 微粒子を極性有機溶媒含有水溶液、好ましくはエタノールなどのアルコール類を含有する水溶液に分散(懸濁)させる。

(工程2) 該極性有機溶媒含有水溶液と同一もしくは異なった極性有機溶媒含有水溶液、好ましくは同一の極性有機溶媒含有水溶液または極性有機溶媒に溶解した脂質を工程1で得られる懸濁液に添加し、混合する。このとき、さらに水溶性高分子誘導体を添加してもよく、ここで添加する水溶性高分子誘導体の量は特に

限定されるものではない。

(工程3) 工程2で得られる混合液に少しずつ水を添加、透析または極性有機溶媒を留去し、混合液中の極性有機溶媒の割合を減少させ、溶解していた脂質、工程2で水溶性高分子誘導体を添加したときは脂質と水溶性高分子誘導体を微粒子表面に集合させ、微粒子表面で脂質膜を形成させ、微粒子を内包する閉鎖小胞を得る。

本発明の方法で用いられる極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の割合は、微粒子が溶解せずに存在し、微粒子を被覆する脂質膜を構成する成分が溶解するという条件さえ満たしていれば特に限定するものではなく、用いる溶媒や微粒子、脂質の種類などにより異なるが、好ましくは30%以上、より好ましくは60~90%である。また、例えば上記工程3中、減少させた後の混合液中の極性有機溶媒の割合は、溶解していた脂質、工程2で水溶性高分子誘導体を添加したときは脂質と水溶性高分子誘導体が微粒子表面に集合し、微粒子表面で脂質膜を形成しうる割合であれば特に限定するものではないが、好ましくは水溶液中の極性有機溶媒の濃度が50%以下である。

本発明の方法で用いられる微粒子の、極性有機溶媒含有水溶液または本発明の方法を用いて得られる製剤に対する割合は、該微粒子を脂質膜で被覆できれば特に限定するものではないが、好ましくは $1\mu\text{g/mL}$ ~ $1\text{g/mL}$ 、さらに好ましくは $0.1$ ~ $500\text{mg/mL}$ である。

本発明の方法で用いられる脂質の、極性有機溶媒含有水溶液または本発明の方法を用いて得られる製剤に対する割合は、微粒子を被覆できれば特に限定するものではないが、好ましくは $1\mu\text{g/mL}$ ~ $1\text{g/mL}$ 、さらに好ましくは $0.1$ ~ $400\text{mg/mL}$ である。

用いる微粒子の種類によらず基本的には前記と同様な方法で微粒子の脂質膜による被覆を行うことができる。

本発明で用いられる極性有機溶媒および脂質としては、市販品を用いることができる。

本発明で用いられる微粒子は、市販品として得られるか、公知の方法により製造することができる。

例えば、微粒子を構成するリポソームの製造には、公知のリポソームの調製方法が適用できる。公知のリポソームの調製方法としては、例えばバンガム (Bangham) らのリポソーム調製法 [J. Mol. Biol., 13, 238 (1965)]、エタノール注入法 [J. Cell. Biol., 66, 621 (1975)]、フレンチプレス法 [FEBS Lett., 99, 210 (1979)]、凍結融解法 [Arch. Biochem. Biophys., 212, 186 (1981)]、逆相蒸発法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194 (1978)]、pH 勾配法 (特許第 2572554 号公報、特許第 2659136 号公報など) などがあげられる。

また、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、多糖類またはその誘導体、ポリオキシエチレン誘導体などによるリポソーム表面改質も任意に行うことができ、これらの表面改質リポソームも本発明の微粒子として用いられる [Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, 93-102 (1995)]。

微粒子を構成するリポソームの製造の際にリポソームを懸濁させる溶液としては、水以外に酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液などを用いてもよい。また、クエン酸、アスコルビン酸、システイン、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの抗酸化剤をリポソーム懸濁液に添加してもよい。また、等張化剤として、例えば、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウムなどの添加も可能である。

また、薬物と脂質とをエタノールなどの有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水などを添加、振とう攪拌し、リポソームを形成させることもできる。

リポソームに薬物を内包するか、リポソームと薬物との複合体を形成するときまたはその後で、水溶性高分子誘導体を添加してもよい。

リポソームの平均粒子径は特に限定するものではなく、所望により自由に選択できる。平均粒子径を調節する方法としては、エクストルージョン法や大きな多重膜リポソーム (MLV) を機械的に粉碎 (マントンゴウリン、マイクロフルイダ

イザーなどを使用)する方法[R. H. Muller, S. Benita, B. Bohm 編著, "Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs", High-Pressure Homogenization Techniques for the Production of Liposome Dispersions: Potential and Limitations, M.Brandl, 267-294 (1998) (Scientific Publishers Stuttgart, Germany)]などがあげられる。

また、微粒子を構成する薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質、微粒子製剤および水溶性高分子誘導体から選ばれる2つ以上を組み合わせた複合体の形成方法は水中で薬物と脂質や高分子などとを混合する方法でもよく、この際、必要であればさらに整粒工程や無菌化工程などを加えることもできる。また、複合体形成をアセトン、エーテルなど種々の溶媒中で行うことも可能である。

本発明で用いる微粒子および／または得られる微粒子を被覆した脂質膜については、それらの表面を抗体などの蛋白質、糖類、糖脂質、アミノ酸、核酸や種々の低分子化合物、高分子化合物などにより修飾したり、単に微粒子および／または脂質膜にこれらの物質を添加して使用することも可能である。

例えば、ターゲッティングに応用するため、被覆した膜に対して、さらに蛋白質（抗体も含む）、ペプチド、脂肪酸類などによる脂質膜表面修飾を行うこともできる [Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, 93-102, (1995)]。

本発明の方法を用いて得られる脂質膜で被覆された微粒子は、そのままでも使用できるが、使用目的、保存条件などにより、マンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトース、グリシンなどの賦形剤を加えて凍結乾燥することもできる。また、グリセリンなどの凍結保存剤を加えて凍結保存してもよい。また、適当な賦形剤と共に造粒、乾燥するなどしてカプセル剤、錠剤、顆粒剤などの経口用製剤に加工してもよい。

本発明の方法を用いて得られる脂質膜で被覆された微粒子は、水以外に酸、ア

ルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液などを用いて懸濁させてもよい。また、クエン酸、アスコルビン酸、システイン、EDTAなどの抗酸化剤をリポソーム懸濁液に添加してもよい。また、等張化剤として、例えば、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウムなどの添加も可能である。

本発明の方法を用いて得られる製剤は、注射剤として用いるのが一般的であるが、経口剤、点鼻剤、点眼剤、経皮剤、坐剤、吸入剤などとして加工して使用することもできる。

本発明で得られる製剤は、例えば血液成分などの生体成分中、例えば血液中や消化管中での薬物の安定化、副作用の低減または腫瘍などの標的臓器への集積性の増大や経口や粘膜吸収の改善などを目的として使用できる。

以下に、本発明の実施例および比較例を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例 1

10mgのデキストランフルオレセインアニオンック (FD) (Molecular Probes 製)、60mgのDOTAP (Avanti 製) および 24mgのPEG-DSPE (Avanti 製) に 3mLの蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ mのポリカーボネートメンブランフィルターに 20回、さらに 0.1 $\mu$ mのポリカーボネートメンブランフィルターに 20回通し、4mLのエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、240mgの卵黄ホスファチジルコリン (EggPC) と 50mgのPEG-DSPEをエタノール 1mLに溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 92mLを徐々に加え、エタノールの濃度が5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心 (1時間、110,000 $\times$ g、25 $^{\circ}$ C) を行い、上清を除去した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) を添加して総脂質濃度が 30mg/mLになるように再懸濁し、リポソーム懸濁液 (製剤 1) を得た。

動的光散乱 (DLS) [A model ELS-800、Otsuka Electronics Ltd. (ELS-800、大塚電子)、以下同様] でリポソームの平均粒子径を測定したところ、134nmであった。



## 実施例 2

10mg の FD、60mg の DOTAP および 24mg の PEG-DSPE に 3mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、4mL のエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、120mg の EggPC と 25mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 92mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1 時間、 $110,000\times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ )を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 2)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、179nm であった。

## 実施例 3

10mg の FD、60mg の DOTAP および 24mg の PEG-DSPE に 3mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、4mL のエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、60mg の EggPC と 12.5mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 92mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1 時間、 $110,000\times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ )を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 3)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、184nm であった。

## 実施例 4

10mg の FD および 60mg の DOTAP に 3mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、4mL のエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、240mg の

EggPC と 74mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 92mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ ）を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 4）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、131nm であった。

#### 実施例 5

10mg の FD および 60mg の DOTAP に 3mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、4mL のエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、240mg の EggPC をエタノール 1mL に溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 92mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ ）を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 5）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、458nm であった。

#### 実施例 6

2.5mg のインスリン-フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ラベル体 (F-Ins) (Sigma 製)、30mg の DOTAP および 12mg の PEG-DSPE に、1.49mL の蒸留水および 0.01mL の 1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、2mL のエタノールを加えた。次に、この懸濁液に、120mg の EggPC と 25mg の PEG-DSPE をエタノール 0.5mL に溶解した溶液を添加した。この懸濁液に蒸留水 46mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ ）

を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 6）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、132nm であった。

#### 実施例 7

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.5mL に、フルオレセインイソチオシアネート結合ホスホチオエート (F-PS) (サイメディア製) を 15mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.25mL を添加し、1mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 120mg/25mg/mL になるように溶解した溶液 0.25mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 23mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000 $\times$ g、25 $^{\circ}$ C）を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液を得た。120 重量部の EggPC に対し 50 重量部の PEG-DSPE を少量のエタノール（リポソーム懸濁液の 4 容量%）に溶解した後、リポソーム懸濁液と混合し、70 $^{\circ}$ C で 2 分間加温した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるよう調整して、リポソーム懸濁液（製剤 7）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、111nm であった。

#### 実施例 8

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.4mL に、F-PS を 10mg/mL になるように蒸留水に溶解さ

せた水溶液 0.2mL を添加し、0.8mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 240mg/50mg/mL になるように溶解した溶液 0.2mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 18.4mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ )を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 8)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、112nm であった。

#### 実施例 9

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、 $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.05\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.4mL に、F-PS を 15mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.2mL を添加し、0.8mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 240mg/50mg/mL になるように溶解した溶液 0.2mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 18.4mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ )を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 9)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、137nm であった。

#### 実施例 10

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、 $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.05\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.4mL に、F-PS を 17.5mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.2mL を添加し、0.8mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液

に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 240mg/50mg/mL になるように溶解した溶液 0.2mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 18.4mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1 時間、110,000×g、25℃) を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 1 0)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、132nm であった。

#### 実施例 1 1

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.4mL に、F-PS を 20mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.2mL を添加し、0.8mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 240mg/50mg/mL になるように溶解した溶液 0.2mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 18.4mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心(1 時間、110,000×g、25℃) を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液(製剤 1 1)を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、164nm であった。

#### 実施例 1 2

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.25mL に、F-PS を 15mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.125mL を添加し、0.5mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 240mg/100mg/mL になるように溶解

した溶液 0.125mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 11.5mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000×g、25℃）を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 1 2）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、122nm であった。

#### 実施例 1 3

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.25mL に、F-PS を 15mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.125mL を添加し、0.5mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、EggPC/PEG-DSPE/エタノールを 360mg/150mg/mL になるように溶解した溶液 0.125mL を添加した。この懸濁液に蒸留水 11.5mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000×g、25℃）を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 1 3）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、165nm であった。

#### 実施例 1 4

30mg/mL の DOTAP と 12mg/mL の PEG-DSPE の懸濁液を、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、粒子径が 80nm 程度のリポソームの懸濁液を得た。スターラーで攪拌下、この懸濁液 250 $\mu$ L に、125 $\mu$ L の 15mg/mL F-PS 水溶液を添加し、0.5mL のエタノ

ールを加えた。さらに、この懸濁液に、120mg の EggPC と 25mg のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60（日本油脂製）をエタノール 1mL に溶解した溶液 125  $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 11.5mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるように調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000 $\times$ g、25 $^{\circ}$ C）を行い、上清を除去した。40  $\mu$ L の PBS を添加して再懸濁し、さらに PBS で希釈して F-PS 3mg/mL のリポソーム懸濁液を得た。EggPC 120 重量部に対して 50 重量部の PEG-DSPE の重量を少量（リポソーム懸濁液の約 1/25 容量）のエタノールに溶解した。リポソーム懸濁液と PEG-DSPE エタノール溶液をそれぞれ 70 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した。ついで PEG-DSPE エタノール溶液にリポソーム懸濁液を添加し、混合後 70 $^{\circ}$ C で 2 分間の加熱後、水冷した。得られたリポソーム懸濁液に PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように希釈して、リポソーム懸濁液（製剤 1 4）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、116nm であった。

#### 実施例 1 5

30mg/mL の DOTAP と 12mg/mL の PEG-DSPE の懸濁液を、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、粒子径が 80nm 程度のリポソームの懸濁液を得た。スターラーで攪拌下、この懸濁液 500  $\mu$ L に、250  $\mu$ L の 15mg/mL F-PS 水溶液を添加し、1mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、120mg の EggPC と 25mg の CREMOPHOR EL（シグマ製）をエタノール 1mL に溶解した溶液 250  $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 23mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるように調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000 $\times$ g、25 $^{\circ}$ C）を行い、上清を除去した。40  $\mu$ L の PBS を添加して再懸濁し、さらに PBS で希釈して F-PS 3mg/mL のリポソーム懸濁液を得た。EggPC 120 重量部に対して 50 重量部の PEG-DSPE を少量（リポソーム懸濁液の約 1/25 容量）のエタノールに溶

解した。リポソーム懸濁液と PEG-DSPE エタノール溶液をそれぞれ 70℃で 2 分間加熱した。ついで PEG-DSPE エタノール溶液にリポソーム懸濁液を添加し、混合後 70℃で 2 分間の加熱後、水冷した。得られたリポソーム懸濁液に PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように希釈してリポソーム懸濁液（製剤 15）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、140nm であった。

#### 実施例 16

30mg/mL の DOTAP と 12mg/mL の PEG-DSPE の懸濁液を、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、粒子径が 80nm 程度のリポソームの懸濁液を得た。スターラーで攪拌下、この懸濁液 250 $\mu$ L に、120 $\mu$ L の 15mg/mL F-PS 水溶液を添加し、0.5mL のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、25mg の Tween80 を 120mg/mL EggPC エタノール溶液 1mL に溶解した溶液 125 $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 11.5mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるように調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000 $\times$ g、25℃）を行い、上清を除去した。40 $\mu$ L の PBS を添加して再懸濁し、さらに PBS で希釈して F-PS 3mg/mL のリポソーム懸濁液を得た。EggPC 120 重量部に対して 50 重量部の PEG-DSPE を少量（リポソーム懸濁液の約 1/25 容量）のエタノールに溶解した。リポソーム懸濁液と PEG-DSPE エタノール溶液をそれぞれ 70℃で 2 分間加熱した。ついで PEG-DSPE エタノール溶液にリポソーム懸濁液を添加し、混合後 70℃で 2 分間の加熱後、水冷した。得られたリポソーム懸濁液に PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように希釈して、リポソーム懸濁液（製剤 16）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、151nm であった。

#### 実施例 17

30mg/mL の DOTAP と 12mg/mL の PEG-DSPE の懸濁液を、ボルテックスミ



キサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、 $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.05\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、粒子径が  $80\text{nm}$  程度のリポソームの懸濁液を得た。スターラーで攪拌下、この懸濁液  $250\mu\text{L}$  に、 $125\mu\text{L}$  の  $15\text{mg/mL}$  F-PS 水溶液を添加し、 $0.5\text{mL}$  のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、 $120\text{mg}$  の EggPC、 $120\text{mg}$  の Span 20（関東化学製）、 $50\text{mg}$  の PEG-DSPE をエタノール  $2\text{mL}$  に溶解した溶液  $125\mu\text{L}$  を添加した。この懸濁液に蒸留水  $11.5\text{mL}$  を徐々に加え、エタノールの濃度が 5% 以下になるように調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、 $110,000\times g$ 、 $25^\circ\text{C}$ ）を行い、上清を除去した。 $40\mu\text{L}$  の PBS を添加して再懸濁し、さらに PBS で希釈して F-PS  $3\text{mg/mL}$  のリポソーム懸濁液を得た。EggPC 120 重量部に対して 50 重量部の PEG-DSPE を少量（リポソーム懸濁液の約  $1/25$  容量）のエタノールに溶解した。リポソーム懸濁液と PEG-DSPE エタノール溶液をそれぞれ  $70^\circ\text{C}$  で 2 分間加熱した。ついで PEG-DSPE エタノール溶液にリポソーム懸濁液を添加し、混合後  $70^\circ\text{C}$  で 2 分間の加熱後、水冷した。得られたリポソームに PBS を添加して総脂質濃度が  $30\text{mg/mL}$  になるように希釈して、リポソーム懸濁液（製剤 17）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、 $131\text{nm}$  であった。

#### 実施例 18

$30\text{mg/mL}$  の DOTAP と  $12\text{mg/mL}$  の PEG-DSPE の懸濁液を、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、 $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.05\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通し、粒子径が  $80\text{nm}$  程度のリポソームの懸濁液を得た。スターラーで攪拌下、この懸濁液  $500\mu\text{L}$  に、 $250\mu\text{L}$  の  $15\text{mg/mL}$  F-PS 水溶液を添加し、 $1\text{mL}$  のエタノールを加えた。さらに、この懸濁液に、 $120\text{mg}$  の EggPC と  $12.5\text{mg}$  の CREMOPHOR EL（シグマ製）をエタノール  $1\text{mL}$  に溶解した溶液  $250\mu\text{L}$  を添加した。この懸

濁液に蒸留水 23mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5%以下になるように調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、110,000×g、25℃）を行い、上清を除去した。40μL の PBS を添加して再懸濁し、さらに PBS で希釈して F-PS 3mg/mL のリポソーム懸濁液を得た。EggPC 120 重量部に対して 50 重量部の PEG-DSPE を少量（リポソーム懸濁液の約 1/25 容量）のエタノールに溶解した。リポソーム懸濁液と PEG-DSPE エタノール溶液をそれぞれ 70℃で 2 分間加熱した。ついで PEG-DSPE エタノール溶液にリポソーム懸濁液を添加し、混合後 70℃で 2 分間の加熱後、水冷した。得られたリポソームに PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように希釈して、リポソーム懸濁液（製剤 1 8）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、133nm であった。

#### 実施例 1 9

589 mg の卵黄レシチン（キューピー製）に 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液を 11.8 mL 加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.1μm のポリカーボネートメンブランフィルターに 30 回通した。この懸濁液 40μL と、1 mg/mL G-CSF（協和発酵製、ナルトグラスチム、遺伝子組換えヒト G-CSF 変異型）水溶液 1 mL および 2 mg/mL デキストラン硫酸ナトリウム（メルク製）水溶液 1 mL の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液（関東化学製）を用いて混合液の液性を pH4 に調整した。この混合液 500μL にエタノール 753μL を加え、50 mg/mL 卵黄レシチンエタノール溶液 80 μL を加えた。この懸濁液に蒸留水 7 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 10%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、146,000×g、25℃）を行い、上清を除去した。水を添加して総量が 500μL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 1 9）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、316 nm であった。

#### 実施例 2 0

588 mg の卵黄レシチンおよび 205 mg の PEG-DSPE に適量のエタノールを室

温で加えて溶解させた後、エタノールを留去し減圧乾燥した。これに 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液を 11.8 mL 加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.1  $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 30 回通した。この懸濁液 40  $\mu$ L と、1 mg/mL の G-CSF 水溶液 1 mL および 2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 1 mL の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH4 に調整した。この混合液 500  $\mu$ L にエタノール 753  $\mu$ L を加え、さらに卵黄レシチンを 50 mg/mL、PEG-DSPE を 16.7 mg/mL 含むエタノールを 80  $\mu$ L 加えた。この懸濁液に蒸留水 7 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 10 %以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、146,000  $\times$  g、25°C）を行い、上清を除去した。水を添加して総量が 500  $\mu$ L になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 20）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、316 nm であった。

#### 実施例 2 1

598 mg の卵黄レシチンおよび 68.8 mg のシヨ糖脂肪酸エステル（三菱化成製）に、適量のエタノールを室温で加えて溶解させた後、エタノールを留去し減圧乾燥した。これに 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液を 12.0 mL 加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.1  $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 30 回通した。この懸濁液 40  $\mu$ L と、1 mg/mL の G-CSF 水溶液 1 mL および 2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 1 mL の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH4 に調整した。この混合液 500  $\mu$ L にエタノール 753  $\mu$ L を加え、さらに卵黄レシチン 50 mg/mL およびシヨ糖脂肪酸エステル 4.5 mg/mL を含むエタノールを 80  $\mu$ L 加えた。この懸濁液に蒸留水 7 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 10%以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、146,000  $\times$  g、25°C）を行い、上清を除去した。水を添加して総量が 500  $\mu$ L になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 2 1）を得た。

DLS でリボソームの平均粒子径を測定したところ、242 nm であった。

## 実施例 2 2

150mg の卵黄レシチンおよび 60mg の PEG-DSPE に 5mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.08 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 571 $\mu$ L と、G-CSF を 1.4 mg/mL 含むリン酸二水素カリウム水溶液 119 $\mu$ L および 2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 167 $\mu$ L の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH 4 に調整した。この混合液 0.5 mL にエタノール 666 $\mu$ L を加え、さらに 120mg の卵黄ホスファチジルコリン (EggPC、日本油脂製) と 25 mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液 167 $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 47 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5% 以下になるよう調整した。得られたリボソーム懸濁液の超遠心 (1 時間、146,000  $\times$  g、4°C) を行い、上清を除去した。蒸留水を添加して再懸濁し、リボソーム懸濁液 (製剤 2 2) を得た。

DLS でリボソームの平均粒子径を測定したところ、126 nm であった。

## 実施例 2 3

150mg の卵黄レシチンおよび 60mg の PEG-DSPE に 5mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.08 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.03 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 7 回通した。この懸濁液 286 $\mu$ L と、G-CSF を 1.4 mg/mL 含むリン酸二水素カリウム水溶液 119 $\mu$ L および 2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 167 $\mu$ L の混合液 286 $\mu$ L とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH 4 に調整した。この混合液 0.25 mL にエタノール 333 $\mu$ L を加え、さらに 120mg の卵黄ホスファチジルコリンと 25 mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液 84 $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 23.5 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5% 以下になるよう調整した。得られたリボソーム懸濁液の超遠心 (1 時間、146,000  $\times$  g、4°C) を行い、上

清を除去した。リン酸二水素カリウム水溶液を添加して再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 2 3）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、146 nm であった。

#### 実施例 2 4

150mg の卵黄レシチンおよび 60mg の PEG-DSPE に 5mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.08 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 428 $\mu$ L と、G-CSF を 1.4 mg/mL 含むリン酸二水素カリウム水溶液 89 $\mu$ L および 2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 125 $\mu$ L の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH 4 に調整した。この混合液 0.5 mL にエタノール 666 $\mu$ L を加え、さらに 120mg の卵黄ホスファチジルコリンと 25 mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液 167 $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 47 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5% 以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、146,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C）を行い、上清を除去した。リン酸二水素カリウム水溶液を添加して再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 2 4）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、134 nm であった。

#### 実施例 2 5

150mg の卵黄レシチンおよび 60mg の PEG-DSPE に 5mL の蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で 0.08 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.05 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 500 $\mu$ L と、インターフェロン  $\alpha$ -2b（Research Diagnostics 製）を 1,000,000 units/mL 含む PBS 溶液 20 $\mu$ L、2 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液 150 $\mu$ L および蒸留水 80 $\mu$ L の混合液とを混合し、1 mol/L および 0.1 mol/L の塩酸水溶液を用いて混合液の液性を pH 4 に調整した。この混合液 0.5 mL にエタノール 666 $\mu$ L を加え、さらに 120mg

の卵黄ホスファチジルコリンと 25 mg の PEG-DSPE をエタノール 1mL に溶解した溶液 167 $\mu$ L を添加した。この懸濁液に蒸留水 47 mL を徐々に加え、エタノールの濃度が 5% 以下になるよう調整した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心（1 時間、146,000 $\times$ g、4°C）を行い、上清を除去した。リン酸二水素カリウム水溶液を添加して再懸濁し、リポソーム懸濁液（製剤 2 5）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、164 nm であった。

#### 比較例 1

215mg の EggPC、61mg の DOTAP および 54mg のコレステロール（Chol）をクロロホルムに溶解させた後、溶媒を減圧下除去した。得られた薄膜に、FD 水溶液（2mg/mL）を 5mL 添加した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。PBS を添加して、総脂質濃度が 30mg/mL になるように調整してリポソーム懸濁液（製剤 a）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、134nm であった。

#### 比較例 2

215mg の EggPC、61mg の DOTAP および 54mg の Chol をクロロホルムに溶解させた後、溶媒を減圧下除去した。得られた薄膜に、FD 水溶液（2mg/mL）を 5mL 添加した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。1471mg/mL の濃度の PEG-DSPE のエタノール溶液を 0.05mL 添加した後、70°C で 5 分間加熱し、リポソーム表面を PEG で被覆した。PBS を添加して、総脂質濃度が 30mg/mL になるように調整してリポソーム懸濁液（製剤 b）を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、143nm であった。

#### 比較例 3

300mg の水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）、100mg の Chol および 100mg の PEG-DSPE をクロロホルムに溶解させた後、溶媒を減圧下除去した。

得られた薄膜に、FD 水溶液 (18.8mg/mL) を 8mL 添加した。この懸濁液を 70°C で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 4 回、さらに 0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 10 回通した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心 (1 時間、110,000 $\times$ g、25°C) を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液 (製剤 c) を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、149nm であった。

#### 比較例 4

215mg の EggPC、61mg の DOTAP および 54mg の Chol をクロロホルムに溶解させた後、溶媒を減圧下除去した。得られた薄膜に、FD 水溶液 (2mg/mL) を 5mL 添加した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心 (1 時間、110,000 $\times$ g、25°C) を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液 (製剤 d) を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、141nm であった。

#### 比較例 5

215mg の EggPC、61mg の DOTAP および 54mg の Chol をクロロホルムに溶解させた後、溶媒を減圧下除去した。得られた薄膜に、FD 水溶液 (2mg/mL) を 5mL 添加した。この懸濁液を室温で 0.4 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに 0.1 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。1471mg/mL の濃度の PEG-DSPE のエタノール溶液を 0.05mL 添加した後、70°C で 5 分間加熱し、リポソーム表面を PEG で被覆した。得られたリポソーム懸濁液の超遠心 (1 時間、110,000 $\times$ g、25°C) を行い、上清を除去した。PBS を添加して総脂質濃度が 30mg/mL になるように再懸濁し、リポソーム懸濁液 (製剤 e) を得た。

DLS でリポソームの平均粒子径を測定したところ、139nm であった。

## 比較例 6

F-PS を PBS に溶解させて、F-PS 溶液（製剤 f）を得た。

## 比較例 7

DOTAP/PEG-DSPE/蒸留水が 30mg/12mg/mL になるように混合し、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を室温で  $0.4\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、 $0.1\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回、さらに  $0.05\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブランフィルターに 20 回通した。この懸濁液 0.5mL に、F-PS を 15mg/mL になるように蒸留水に溶解させた水溶液 0.25mL を添加し、総脂質濃度が 28mg/mL であるリボソーム懸濁液（製剤 g）を得た。

DLS でリボソームの平均粒子径を測定したところ、108nm であった。

次に、試験例により、本発明の効果について説明する。

## 試験例 1

実施例 1～5 で調製した製剤 1～5 および比較例 1～5 で調製した製剤 a～e の超遠心分離（1 時間、 $110,000\times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ ）を行った。各製剤中の FD および超遠心分離後の上清中の FD を定量するために、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 485nm、蛍光波長 530nm での蛍光強度を測定した。また、各製剤のリボソーム中のホスファチジルコリン（PC）を、リン脂質 C テストワコー（和光純薬製）による酵素法により定量した。総脂質濃度は PC 濃度から仕込み比で換算した。FD のリボソームへの脂質当たりの封入効率および超遠心分離による内包率を、下記式（1）および（2）で算出した。

$$\text{脂質当たりの封入効率}(\text{mgFD}/\text{mg 総脂質})=(A^1-C^1)/B^1 \quad (1)$$

$A^1$  : 各製剤中の FD 量 (mg/mL)

$B^1$  : 各製剤中の総脂質量 (mg/mL)

$C^1$  : 上清中の FD 量 (mg/mL)

$$\text{超遠心分離による内包率}(\%)=[(A^1-C^1)\div B^1]/(D^1\div E^1)\times 100 \quad (2)$$

$A^1$  : 各製剤中の FD 量 (mg/mL)



B<sup>1</sup> : 各製剤中の総脂質量 (mg/mL)

C<sup>1</sup> : 上清中の FD 量 (mg/mL)

D<sup>1</sup> : 実施例 1～5 または比較例 1～5 での仕込み FD 量 (mg/mL)

E<sup>1</sup> : 実施例 1～5 または比較例 1～5 での仕込み総脂質量 (mg/mL)

結果を第 1 表および第 2 表に示す。

第 1 表 : 脂質当たりの封入効率

封入効率 (mgFD/mg 総脂質)	
製剤 1	0.015
製剤 2	0.031
製剤 3	0.063
製剤 4	0.019
製剤 5	0.027
製剤 a	0.021
製剤 b	0.009
製剤 c	0.036
製剤 d	0.011
製剤 e	0.007

第 2 表 : 超遠心分離による内包率

内包率 (%)	
製剤 1	54
製剤 2	72
製剤 3	97
製剤 4	72
製剤 5	81
製剤 a	70
製剤 b	36
製剤 c	12
製剤 d	38
製剤 e	26

第 1 表は、製剤 1～5 のリボソームでは製剤 a および c と同様に封入効率が高いことを示しているが、仕込みの FD 量/総脂質量が考慮されていない。製剤 1～5 および a～e を調製する際の仕込み量はそれぞれ異なっていて、特に製剤 c

では脂質に対して多量の FD を用いて調製されているので、仕込み量を考慮すると、製剤 1～5 および a のリポソームは総脂質量に対して FD 量が多いリポソームであると言える。

第 2 表で示す内包率は、第 1 表の結果を仕込みの際の FD 量／総脂質量で割った値の百分率であり、仕込みの際の FD 量／総脂質量が反映されている。第 2 表は、製剤 1～5 および a のリポソームでは FD の内包率が高いのに対し、製剤 b～e のリポソームでは内包率が低いことを示している。これは製剤 b～e のリポソームでは内包されない Free（遊離）FD が多く存在し、調製過程や内包率の分析過程で Free FD が除去されていることを示す。この結果から、製剤 b～e では仕込んだ FD のうちリポソームに封入されたまたはリポソーム表面に穏やかに結合した（静電的に吸着した）FD が少なく、有効利用される FD が少ないことが分かる。

#### 試験例 2

実施例 1～5 で調製した製剤 1～5 および比較例 1～5 で調製した製剤 a～e の各 0.02mL に PBS 1.98mL を加えて混合し、試料液とした。混合直後、試料液 0.5mL をゲルろ過（Sephacrose CL-4B、 $\phi$ 10mm×20cm、移動相：PBS、試料添加量：2mL、フラクション採取量：約 2mL）した。リポソーム画分とリポソームに内包されていない成分の画分を分離し、溶出液の蛍光強度を試験例 1 と同様にして測定した。ゲルろ過による内包率を、式（3）で算出した。

$$\text{ゲルろ過による内包率(\%)} = [F^1 / (F^1 + G^1)] \times 100 \quad (3)$$

$F^1$ ：リポソーム画分中の FD 量（mg）

$G^1$ ：リポソームに内包されていない成分の画分中の FD 量（mg）

結果を第 3 表に示す。

第3表：ゲルろ過による内包率

	内包率 (%)
製剤 1	61
製剤 2	71
製剤 3	75
製剤 4	65
製剤 5	55
製剤 a	13
製剤 b	16
製剤 c	82
製剤 d	26
製剤 e	70

ゲルろ過では、Free FD だけでなく、リポソーム表面に穏やかに結合した（静電的に吸着した）FD も除去される。また、製剤の安定性が悪い場合、内水相に存在する FD の一部が漏出してしまふ。第3表は、製剤 1～5、c および e のリポソームの内包率が高いことを示している。これは FD がリポソームの内水相に多く存在していることを示している。しかしながら、第3表では仕込みの際の FD 量／総脂質量は考慮されておらず、製剤 c は脂質に対して多量の FD を用いて調製されているので、当然高い内包率となっている。一方、製剤 a、b および d は低い値を示しており、FD がリポソーム内にしっかりと封入されておらず、安定性の悪い製剤であると言える。

第2表は製造性を示しており、第3表はリポソームの安定性を示している。第2表および第3表より、製剤 a は、製造性はよいが十分に安定ではなく、逆に、製剤 c および e は安定であるが製造性が悪く、さらに、製剤 b および d は製造性、安定性ともに悪いことが明らかであり、一方、製剤 1～5 は製造性、安定性ともによりことが明らかとなった。これは製剤 1～5 でじゃ FD がリポソーム内部にしっかりと内包されている、すなわち FD-カチオン脂質複合体が脂質で被覆できていることを示している。

### 試験例 3

実施例 6 で調製した製剤 6 の超遠心分離（1 時間、 $110,000 \times g$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ ）を行っ

た。製剤 6 中の F-Ins および超遠心分離後の上清中の F-Ins を定量するために、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 485nm、蛍光波長 530nm での蛍光強度を測定した。また、製剤のリポソーム中の PC は、リン脂質 C テストワコー（和光純薬製）による酵素法により定量した。総脂質濃度は PC 濃度から仕込み比で換算した。F-Ins のリポソームへの脂質当たりの封入効率および超遠心分離による内包率を、式（4）および（5）で算出した。

$$\text{脂質当たりの封入効率}(\text{mg F-Ins}/\text{mg 総脂質})=(A^2-C^2)/B^2 \quad (4)$$

$A^2$  : 製剤 6 中の F-Ins 量 (mg/mL)

$B^2$  : 製剤 6 中の総脂質量 (mg/mL)

$C^2$  : 上清中の F-Ins 量 (mg/mL)

$$\text{超遠心分離による内包率}(\%)=[(A^2-C^2)/B^2]/(D^2/E^2) \times 100 \quad (5)$$

$A^2$  : 製剤 6 中の F-Ins 量 (mg/mL)

$B^2$  : 製剤 6 中の総脂質量 (mg/mL)

$C^2$  : 上清中の F-Ins 量 (mg/mL)

$D^2$  : 実施例 6 での仕込み F-Ins 量 (mg/mL)

$E^2$  : 実施例 6 での仕込み総脂質量 (mg/mL)

結果を第 4 表および第 5 表に示す。

第 4 表：脂質当たりの封入効率

封入効率 (mg F-Ins/mg 総脂質)	
製剤 6	0.010

第 5 表：超遠心分離による内包率

内包率 (%)	
製剤 6	73

第 4 表は、製剤 6 では、脂質当たりの仕込み F-Ins 量が少ないにも関わらず、F-Ins のリポソームの脂質当たりの封入効率が高いことを示している。

超遠心分離による内包率においては、リポソーム表面に穏やかに結合している F-Ins も内包したものとして測定されている。第 5 表は、製剤 6 のリポソームでは、製剤 1～5 のリポソームの場合と同様に、内包率が高いことを示している。

#### 試験例 4

実施例 6 で調製した製剤 6 (0.02mL) に PBS 1.98mL を加えて混合し、試料液とした。混合直後、試料液 0.5mL をゲルろ過 (Sephacrose CL-4B、 $\phi$ 10mm×20cm、移動相：PBS、試料添加量：2mL、フラクション採取量：約 2mL) した。リポソーム画分とリポソームに内包されていない成分の画分を分離し、溶出液の蛍光強度を試験例 3 と同様にして測定した。ゲルろ過による内包率を、式 (6) で算出した。

$$\text{ゲルろ過による内包率(\%)} = [F^2 / (F^2 + G^2)] \times 100 \quad (6)$$

$F^2$  : リポソーム画分中の F-Ins 量 (mg)

$G^2$  : リポソームに内包されていない成分の画分中の F-Ins 量 (mg)

結果を第 6 表に示す。

第 6 表：ゲルろ過による内包率

内包率 (%)	
製剤 6	73

ゲルろ過による内包率は、リポソーム表面に穏やかに結合している F-Ins が除去された後測定されている。第 6 表は、製剤 6 のリポソームでは、製剤 1～5 の場合と同様に、内包率が高く、F-Ins がリポソームの内水相に多く存在していることを示している。すなわち、製剤 6 は、F-Ins がリポソーム内にしっかりと封入され、安定性のよい製剤であるということができ、F-Ins-脂質複合体が脂質で被覆できていることを示している。

#### 試験例 5

実施例 7～13 で調製した製剤 7～13 の超遠心分離 (1 時間、110,000×g、25℃) を行った。各製剤中の F-PS および超遠心分離後の上清中の F-PS を定量

するために、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 485nm、蛍光波長 530nm での蛍光強度を測定した。また、各製剤のリボソーム中の PC は、リン脂質 C テストワコー（和光純薬製）による酵素法により定量した。総脂質濃度は PC 濃度から仕込み比で換算した。F-PS のリボソームへの脂質当たりの封入効率および超遠心分離による内包率を、下記式（7）および（8）で算出した。

$$\text{脂質当たりの封入効率}(\text{mgF-PS}/\text{mg 総脂質})=(A^3-C^3)/B^3 \quad (7)$$

$A^3$  : 各製剤中の F-PS 量 (mg/mL)

$B^3$  : 各製剤中の総脂質量 (mg/mL)

$C^3$  : 上清中の F-PS 量 (mg/mL)

$$\text{超遠心分離による内包率}(\%)=[(A^3-C^3)/B^3]/(D^3/E^3) \times 100 \quad (8)$$

$A^3$  : 各製剤中の F-PS 量 (mg/mL)

$B^3$  : 各製剤中の総脂質量 (mg/mL)

$C^3$  : 上清中の F-PS 量 (mg/mL)

$D^3$  : 実施例 7 ~ 13 での仕込み F-PS 量 (mg/mL)

$E^3$  : 実施例 7 ~ 13 での仕込み総脂質量 (mg/mL)

結果を第 7 表および第 8 表に示す。

第 7 表 : 脂質当たりの封入効率

封入効率 (mgF-PS / mg 総脂質)	
製剤 7	0.058
製剤 8	0.034
製剤 9	0.031
製剤 10	0.050
製剤 11	0.059
製剤 12	0.030
製剤 13	0.024

第 8 表：超遠心分離による内包率

	内包率 (%)
製剤 7	109
製剤 8	126
製剤 9	76
製剤 10	107
製剤 11	111
製剤 12	86
製剤 13	97

第 7 表は、製剤 7～13 では F-PS の脂質当たりの封入効率が高いことを示している。

超遠心分離による内包率においてはリポソーム表面に穏やかに結合している F-PS も内包されたものとして測定されている。第 8 表は、製剤 7～13 のリポソームが F-PS の内包率の高いリポソームであることを示している。

#### 試験例 6

実施例 7～9、11 および 12 で調製した製剤 7～9、11 および 12 の各 0.02mL に PBS 1.98mL を加えて混合し、試料液とした。混合直後、試料液 0.5mL をゲルろ過 (Sephacrose CL-4B、 $\phi$ 10mm $\times$ 20cm、移動相：PBS、試料添加量：2mL、フラクション採取量：約 2mL) した。リポソーム画分とリポソームに内包されていない成分の画分を分離し、溶出液の蛍光強度を試験例 5 と同様にして測定した。ゲルろ過による内包率を、式 (9) で算出した。

$$\text{ゲルろ過による内包率(\%)} = [F^3 / (F^3 + G^3)] \times 100 \quad (9)$$

$F^3$ ：リポソーム画分中の F-PS 量 (mg)

$G^3$ ：リポソームに内包されていない成分の画分中の F-PS 量 (mg)

結果を第 9 表に示す。

第9表：ゲルろ過による内包率

	内包率 (%)
製剤 7	84
製剤 8	96
製剤 9	94
製剤 1 1	90
製剤 1 2	89

ゲルろ過による内包率は、リポソーム表面に穏やかに結合している F-PS が除去された後測定されている。第9表は、製剤7～9、1 1および1 2のリポソームでは、内包率が高く、F-PS がリポソームの内水相に多く存在していることを示している。すなわち、製剤7～9、1 1および1 2は、F-PS がリポソーム内にしっかりと封入され、安定性のよい製剤であるということができ、F-PS-脂質複合体が脂質で被覆できていることを示している。

#### 試験例 7

腫瘍移行性の比較を行った。ヒト腎臓癌細胞 Caki-1 株の 2mm 角腫瘍片を BALB/cAJcl-nu 系の 6 週齢ヌードマウス(日本クレア)の右体側部皮下に移植し、移植後 20 日目に腫瘍体積が 102～349mm<sup>3</sup>に達したマウスを 1 群 3 匹になるように群分けし、実施例 7 で調製した製剤 7 および比較例 6 で調製した製剤 f を F-PS 25mg/kg の容量で、注射筒 (26G、1mL テルモ製) を用いてマウス尾静脈より投与した。経時的に腫瘍を摘出し、腫瘍をホモジナイズし、ホモジネート中の蛍光強度を試験例 5 と同様にして測定した。F-PS の腫瘍移行性は、各時点の腫瘍内 F-PS 量 ( $\mu\text{g/g}$ ) を算出して評価した。

結果を第 1 図に示す。

第 1 図は、製剤 7 を投与したマウスでは製剤 f を投与したマウスに比べて腫瘍への F-PS の移行量が増加していることを示している。

#### 試験例 8

実施例 1 で調製した製剤 1 の電子顕微鏡による形態観察を行った。1%モリブデン酸アンモニウム水溶液 (アンモニアを用いて pH 7.3 に調製) に、製剤 1 を総脂



質濃度が 0.5mg/mL になるように添加した。これをコロジオン膜張付メッシュ（400 メッシュ、日新 EM）に滴下し、約 1 分後に余分な水分をろ紙で吸い取った後、乾燥させた。透過電子顕微鏡（H-7000 型、日立）を用い、加速電圧 75kV で観察した。

その結果、製剤 1 には、外側を囲む膜とは形状の異なるかたまりを内部にもつ粒子が多く存在していた。すなわち、この結果は、内部の粒子が脂質二重膜により覆われていることを示している。

#### 試験例 9

実施例 1 で調製した製剤 1 並びに比較例 1 および 2 で調製した製剤 a および b をウレタン麻酔下の CD(SD)IGS 雄性ラット（体重 200～300g、1 群 2 または 3 匹）に大腿静脈より投与した（投与量；総脂質 10mg/kg 相当）。ヘパリン処理したシリンジで経時的に頸静脈より血液を採取し、遠心分離（5 分、10,000×g、4℃）後、血漿中の FD の蛍光強度を試験例 1 と同様に測定し、血漿中の FD 濃度を算出した。

結果を第 2 図に示す。

第 2 図は、製剤 1 を投与したラットでは製剤 a または b を投与したラットに比べて、FD の血漿中濃度推移が高いことを示している。すなわち、FD-脂質複合体が脂質で被覆されることにより血中滞留性が改善されたこと示している。

#### 試験例 10

実施例 7～13 で調製した製剤 7～13 および比較例 6 で調製した製剤 f をウレタン麻酔下の CD(SD)IGS 雄性ラット（体重 200～300g、1 群 2 匹）に大腿静脈より投与した（投与量；総脂質 10mg/kg 相当）。ヘパリン処理したシリンジで経時的に頸静脈より血液を採取し、遠心分離（5 分、10,000×g、4℃）後、血漿中の F-PS の蛍光強度を試験例 5 と同様に測定し、血漿中の FD 濃度を算出した。

結果を第 3 図に示す。

第 3 図は、製剤 7～13 を投与したラットでは製剤 f を投与したラットに比べて、いずれも FD の血漿中濃度推移が高いことを示している。

## 試験例 1 1

実施例 7 で調製した製剤 7 および比較例 6 ～ 7 で調製した製剤 f ～ g を BALB/cA Jcl 雄性マウス（体重 20～30g、1 群 2 または 3 匹）に尾静脈より投与した（投与量；総脂質 10mg/kg 相当）。エーテル麻酔下、ヘパリン処理したシリンジで大腿静脈より血液を採取し、遠心分離（5 分、10,000×g、4℃）後、血漿中の F-PS の蛍光強度を試験例 5 と同様にして測定し、血漿中の F-PS 濃度を算出した。

結果を第 4 図に示す。

第 4 図は、製剤 f ～ g を投与したマウスでは F-PS が投与後速やかに血漿中から消失したのに対して、製剤 7 を投与したマウスでは F-PS の血漿中濃度推移が高いことを示している。

## 試験例 1 2

実施例 1 3 ～ 1 8 で調製した製剤 1 3 ～ 1 8 の超遠心分離（1 時間、110,000×g、25℃）を行った。各製剤中の F-PS および超遠心分離後の上清中の F-PS を定量するために、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 485nm、蛍光波長 530nm での蛍光強度を測定した。F-PS のリポソームへの超遠心分離による内包率を、下記式（10）で算出した。

$$\text{超遠心分離による内包率(\%)} = [(A^4 - B^4)] / B^4 \times 100 \quad (10)$$

A<sup>4</sup>：各製剤中の F-PS 量（mg/mL）

B<sup>4</sup>：上清中の F-PS 量（mg/mL）

結果を第 10 表に示す。

第 10 表：超遠心分離による内包率

	内包率 (%)
製剤 1 3	98
製剤 1 4	95
製剤 1 5	97
製剤 1 6	98
製剤 1 7	95
製剤 1 8	99

## 試験例 1 3

実施例 7 および 1 4 ~ 1 8 で調製した製剤 7 および 1 4 ~ 1 8 の各 0.08mL にウシ胎児血清 (FBS) 7.92mL を加えて混合し、試料液とした。混合直後 (0 時間) と 37°C で 6 ~ 168 時間放置後にサンプリングし、各試料液 0.5mL をゲルろ過 (Sephacrose CL-4B、 $\phi$  10mm  $\times$  20cm、移動相 : PBS、試料添加量 : 2mL、フラクション採取量 : 約 2mL) した。リポソーム画分とリポソームに内包されていない成分の画分を分離した。各フラクションの F-PS を定量するために、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 485nm、蛍光波長 530nm での蛍光強度を測定した。リポソームからの F-PS 漏出量を、式 (1 1) で算出した。

$$\text{F-PS 漏出量(\%)} = [B^5 / (A^5 + B^5)] \times 100 \quad (1 1)$$

$A^5$  : リポソーム画分中の F-PS 量 (mg)

$B^5$  : リポソームに内包されていない成分の F-PS 量 (mg)

結果を第 1 1 表に示す。

第 1 1 表 : FBS 中のリポソームからの F-PS 漏出性 (漏出%)

時間 (時間)	0	6	24	48	72	96	168
製剤 7	17	28	41	51	52	-	64
製剤 14	30	47	55	63	62	-	65
製剤 15	35	48	54	57	-	-	72
製剤 16	29	44	56	55	-	-	62
製剤 17	15	21	26	-	-	43	47
製剤 18	27	43	51	55	-	-	57

第 1 1 表は、製剤 7 および 1 4 ~ 1 8 中の F-PS がリポソームから経時的に漏出することを示している。すなわち、本発明の方法を用いて微粒子を脂質膜で被覆することにより、体内のターゲット部位に集積した後に脂質膜に内包された薬物などの微粒子を経時的に漏出することで、経時的な薬効の発現が可能である。

#### 試験例 1 4

実施例 1 9 ~ 2 1 で調製した製剤 1 9 ~ 2 1 のゲルろ過を行った。リポソーム懸濁液 0.5 mL を試料液とし、ゲルろ過カラム (Sephacrose CL-4B、 $\phi$  10 mm  $\times$  20 cm、移動相 : PBS、試料添加量 : 0.5 mL、フラクション採取量 : 約 1.5 mL) に添加した。リポソーム画分と遊離 G-CSF 画分を分離し、それぞれ遠心エバポレーションにより濃縮した。濃縮したリポソーム画分には蒸留水を加え、全量を 2 mL とした。このリポソーム懸濁液 200  $\mu$ L に 10% のラウリル硫酸ナトリウムを含む pH 7 の 50 mmol/L リン酸緩衝液を 50  $\mu$ L、蒸留水を 150  $\mu$ L 加えて攪拌した。さらに 2-プロパノール 400  $\mu$ L を加えて攪拌し完全にリポソームを破壊した後、下記の移動相 I を 800  $\mu$ L 加えて混和した。遠心分離 (10000  $\times$  g、5 分間) を行い、上清を HPLC 分析した。濃縮した遊離 G-CSF 画分には、2% プルロニック F127 (シグマ製)、0.5% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む 50% アセトニトリル水溶液を加え、全量を 5 mL とし HPLC 分析した。

カラム : YMCpack ODS-AM、 $\phi$  6.0 mm  $\times$  15 cm

移動相 : I 0.5% の TFA を含む 50% アセトニトリル

II 0.5% の TFA を含む 80% アセトニトリル

分析開始後の II 液の割合を、0 ~ 5 分は 0%、5 ~ 35 分で 0% ~ 100% に直線的

に増加、35～45 分は 100%とした。

検出：280 nm

分析温度：30℃

流速：1 mL/分

注入量：200  $\mu$ L

各リポソームに内包された G-CSF の内包率を、式（12）で算出した。

$$\text{内包率(\%)} = A^6 / (A^6 + B^6) \times 100 \quad (12)$$

$A^6$ ：リポソーム画分中の G-CSF 量 ( $\mu$ g)

$B^6$ ：遊離 G-CSF 画分中の G-CSF 量 ( $\mu$ g)

結果を第 12 表に示す。

第 12 表：内包率

	内包率 (%)
製剤 19	100
製剤 20	100
製剤 21	100

第 12 表は、製剤 19～21 はゲル濾過で分離される遊離の G-CSF を含まないものであることを示している。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は腫瘍への F-PS の移行量を示すものである。横軸は製剤投与後の時間（時間）を、縦軸は腫瘍内 F-PS 量を表す。

第 2 図は血漿中の FD の濃度を示すものである。横軸は製剤投与後の時間（時間）を、縦軸は血漿中の FD の濃度を表す。

第 3 図は血漿中の F-PS の濃度を示すものである。横軸は製剤投与後の時間（時間）を、縦軸は血漿中の F-PS の濃度を表す。

第 4 図は血漿中の F-PS の濃度を示すものである。横軸は製剤投与後の時間（時間）を、縦軸は血漿中の F-PS の濃度を表す。

第 1～4 図に用いた符号は、以下の意味を表す。

第 1 図

—●—：製剤 7 投与群

—○—：製剤 f 投与群

#### 第 2 図

—●—：製剤 1 投与群

—◇—：製剤 a 投与群

—△—：製剤 b 投与群

#### 第 3 図

—●—：製剤 7 投与群

—◇—：製剤 8 投与群

—◆—：製剤 9 投与群

—△—：製剤 10 投与群

—▲—：製剤 11 投与群

—□—：製剤 12 投与群

—■—：製剤 13 投与群

—+—：製剤 f 投与群

#### 第 4 図

—●—：製剤 7 投与群

—+—：製剤 f 投与群

—◆—：製剤 g 投与群

#### 産業上の利用可能性

本発明により、安全、簡便かつ効率の良い脂質膜による微粒子の被覆が可能となった。

## 請求の範囲

1. 微粒子が分散し、かつ脂質が溶解した極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって、該微粒子を脂質膜で被覆することを特徴とする、脂質膜による微粒子の被覆方法。

2. 極性有機溶媒含有水溶液に微粒子を分散させ（液A）、該極性有機溶媒含有水溶液と同一もしくは異なった極性有機溶媒含有水溶液または極性有機溶媒に脂質を溶解させ（液B）、液Aと液Bを混合し（液C）、次いで液C中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって（液D）、該微粒子を脂質膜で被覆することを特徴とする、脂質膜による微粒子の被覆方法。

3. 液Bが脂質と一緒に水溶性高分子誘導体（I）を溶解させて得られる溶液である請求の範囲2に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

4. 液Aおよび液B中の極性有機溶媒の濃度が30%以上である請求の範囲2または3に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

5. 液Aおよび液B中の極性有機溶媒の濃度が60～90%である請求の範囲2または3に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

6. 液D中の極性有機溶媒の濃度が50%以下である請求の範囲5に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

7. 微粒子が請求の範囲3に記載の水溶性高分子誘導体（I）と同一または異なった水溶性高分子誘導体を含有する微粒子である請求の範囲1～6のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

8. 微粒子が薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質および微粒子製剤から選ばれる一つ以上を含有する微粒子である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

9. 微粒子が薬物を含有する微粒子である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

10. 微粒子が薬物と脂質集合体、リポソーム、エマルジョン中の微粒子、天然高分子、合成高分子、金属コロイド、カチオン脂質、アニオン脂質および微粒子製剤から選ばれる一つ以上との複合体である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

11. 微粒子が薬物とカチオン脂質との複合体である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

12. 微粒子が薬物とアニオン脂質との複合体である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

13. 微粒子が薬物とリン脂質を含有するリポソームとデキストラン硫酸ナトリウムとの複合体である請求の範囲1～7のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

14. 薬物がペプチド、蛋白質、核酸、低分子化合物、糖類および高分子化合物から選ばれる薬物である請求の範囲8～13のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

15. 極性有機溶媒がアルコール類、グリコール類およびポリアルキレングリコール類から選ばれる一つ以上である請求の範囲1～14のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

16. アルコール類がエタノールである請求の範囲15に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

17. グリコール類がプロピレングリコールである請求の範囲15または16に記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

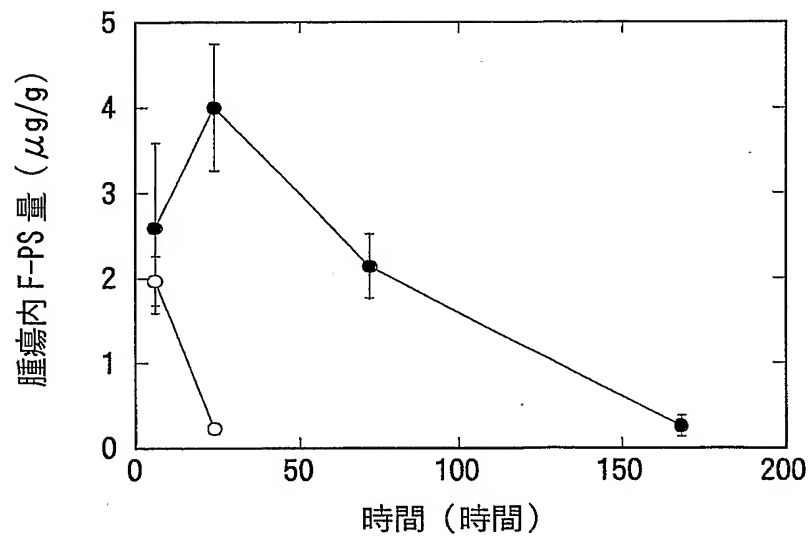
18. ポリアルキレングリコール類がポリエチレングリコールである請求の範囲15～17のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

19. 水溶性高分子誘導体がポリエチレングリコール化脂質、ポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールヒマシ油誘導体、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル類、ポリエチレングリコールステアリン酸エステル類、エチレングリコールプロピレングリコール共重合体およびグ

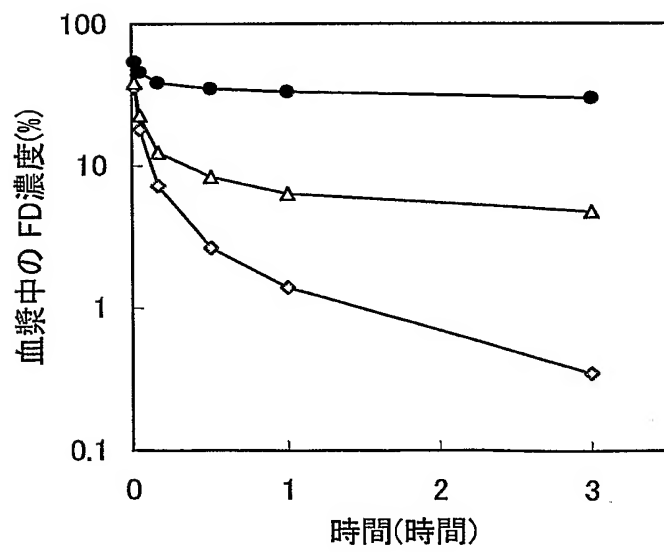


リセリンエステル類から選ばれる一つ以上である請求の範囲 3 ～ 18 のいずれかに記載の脂質膜による微粒子の被覆方法。

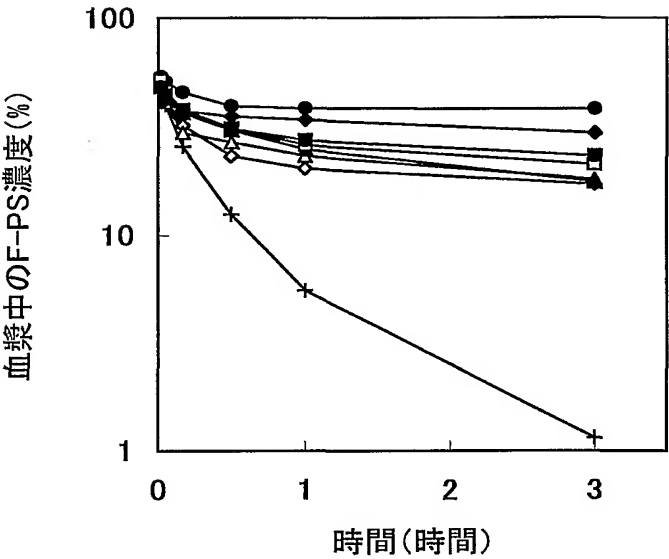
第 1 図



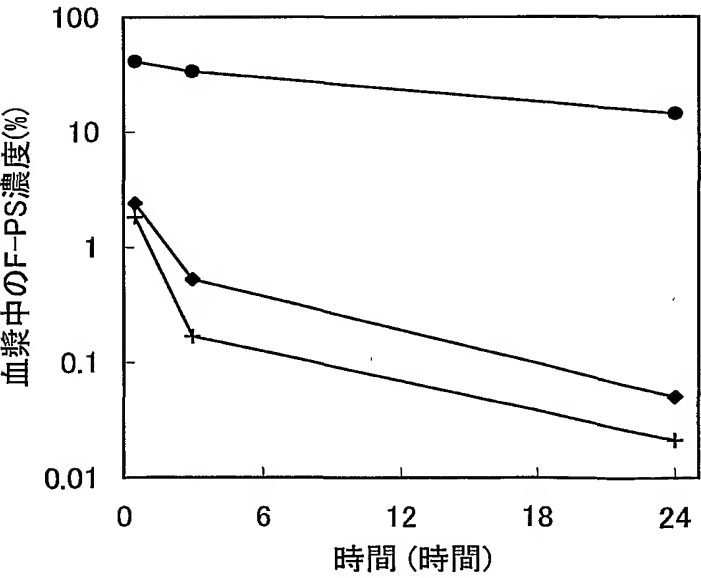
第 2 図



第 3 図



第 4 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08759

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K 9/127, A61K47/24, A61K47/44, A61K31/711, A61K31/70, A61K31/74,  
A61K48/00, A61K38/02, B01J13/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K 9/127, A61K47/24, A61K47/44, A61K31/711, A61K31/70, A61K31/74,  
A61K48/00, A61K38/02, B01J13/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5100591 A (Medgenix Group SA), 31 March, 1992 (31.03.92), column 5, line 47 to column 6, line 19	1, 2, 4-18
Y	column 8, lines 25 to 38, column 9, lines 19 to 23 column 15, lines 15 to 32 & EP 418153 B2 & FR 2651680 A & JP 03-169808 A	3, 19
X	EP 275358 A (Okawara Kakoki Co., Ltd.), 27 July, 1988 (27.07.88),	1-18
Y	column 2, line 40 to column 4, line 53 column 6, line 25 to column 8, line 7 & CN 87108128 A & KR 9502149 B1 & US 4943449 A & JP 63-151353 A	19
Y	WO 90/04384 A (Royal Free Hospital School of Medicine), 03 May, 1990 (03.05.90), page 4, lines 22 to 33 & EP 445131 A & US 6132763 A	3, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 December, 2001 (05.12.01)

Date of mailing of the international search report  
18 December, 2001 (18.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08759

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 03-218309 A (Terumo Corporation), 25 September, 1991 (25.09.91) (Family: none) Claims	3,19
Y	JP 04-244017 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 01 September, 1992 (01.09.92) (Family: none) Par. Nos. [0006] to [0014]	3,19

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/08759

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 9/127 A61K47/24 A61K47/44 A61K31/711  
 A61K31/70 A61K31/74 A61K48/00 A61K38/02  
 B01J13/12

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 9/127 A61K47/24 A61K47/44 A61K31/711  
 A61K31/70 A61K31/74 A61K48/00 A61K38/02  
 B01J13/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 5100591 A (MEDGENIX GROUP S A) 31. 3月. 1992 (31. 03. 92) 第5欄第47行-第6欄第19行	1, 2 4-18
Y	第8欄第25-38行 第9欄第19-23行 第15欄第15-32行 & EP 418153 B2 & FR 2651680 A & JP 03-169808 A	3, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 12. 01

国際調査報告の発送日

18.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲英子

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 275358 A (OKAWARA KAKOKI CO LTD) 27. 7月. 1988 (27. 07. 88)	1-18
Y	第2欄第40行-第4欄第53行 第6欄第25行-第8欄第7行 & CN 87108128 A & KR 9502149 B1 & US 4943449 A & JP 63-151353 A	19
Y	WO 90/04384 A (ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL MED) 3. 5月. 1990 (03. 05. 90) 第4頁第22-33行 & EP 445131 A & US 6132763 A	3, 19
Y	JP 03-218309 A (テルモ株式会社) 25. 9月. 1991 (25. 09. 91) (ファミリーなし) 特許請求の範囲	3, 19
Y	JP 04-244017 A (協和醗酵工業株式会社) 1. 9月. 1992 (01. 09. 92) (ファミリーなし) 【0006】-【0014】欄	3, 19